＊ 2013 年 7 月改訂 (第 2 版)
2012 年 9 月作成 (第 1 版)

この使用説明書をよく読んでから使用してください

研究用試薬

スイフトジーン® CPE産生ウエルシュ菌 「カイノス」

【はじめに】

ウエルシュ菌 (*Clostridium perfringens*) はヒトなどの腸管内常在菌であり、土壌や河川、海洋の泥などに広く分布しているグラム陽性の偏性嫌気性菌である。ウエルシュ菌による感染症は食中毒、ガス壊疽、化膿性感染症、敗血症等があり、食中毒事例から分離されるウエルシュ菌は、エンテロトキシン (*Clostridium perfringens* enterotoxin, CPE) を産生する耐熱芽胞形成菌である。CPEは蛋白毒素であるため加熱により失活するが、大量のウエルシュ菌 (10^8個以上) で汚染された食品を摂取した場合、腸内でウエルシュ菌が増殖し、芽胞を形成する際にCPEが遊離され食中毒症状が発現する。

本製品は、食品試料中のウエルシュ菌を培養することなく、CPE遺伝子を検出するキットである。本製品の開発は、食品の安心・安全確保推進研究事業の「食品中の毒素産生食中毒細菌および毒素の直接試験法の研究」の分担研究として実施されている。

【全般的な注意】

1) 本製品は研究用試薬です。診療上の診断に用いることはできません。
2) 使用説明書に記載以外の使用方法については保証を致しません。
3) 使用する機器の添付文書及び取扱説明書をよく読んでから使用してください。詳細は機器メーカーにお問い合わせください。
4) 本製品は核酸 (RNA) を対象とし、大量のRNAを生成し、検出する試薬です。検体や増幅産物の取り扱いを誤ると検査結果に大きく影響しますので、遺伝子操作に関する一般的な注意をよく理解して実施してください。

【形状・構造等（キットの構成）】

1. 抽出・増幅試薬
   1) 核酸抽出試液
   2) NASBA試薬 (NASBA Reaction Buffer) ：
      dNTPs, NTPs
   3) プライマー溶液 ：
      CPE用プライマー
   4) NASBA酵素試薬 (NASBA Enzyme) ：
      AMV-RT, RNase H, T7 RNA polymerase
   5) NASBA酵素溶解液
   6) 反応用チューブ
2. 検出試薬
   1) 検出ストリップ
   2) 展開液
   3) プレートシール

【測定原理】

1. 原理

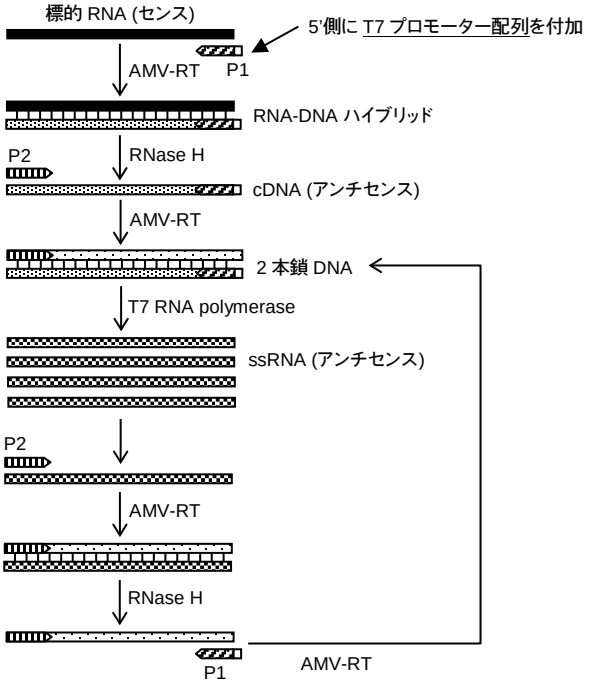
本製品はNASBA法[1] (Nucleic Acid Sequence-Based Amplification) による核酸増幅及び核酸クロマトグラフィー[2] を用いて、検体中のCPE産生ウエルシュ菌のmRNAを検出します。

A. 抽出

界面活性剤と熱により検体中の菌体を破壊し、RNAを抽出します。

B. 核酸増幅法

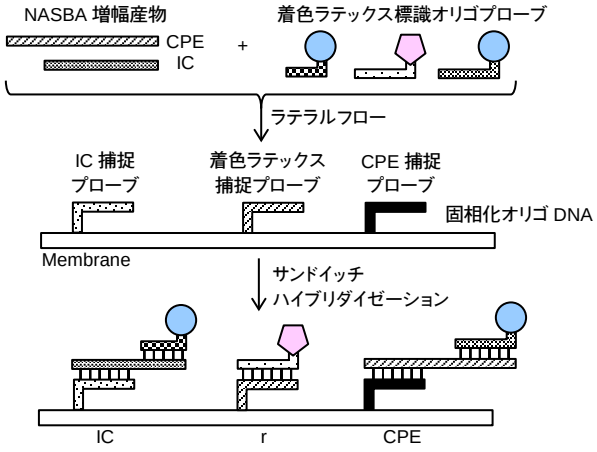
CPE産生ウエルシュ菌のCPE mRNAを鋳型とし、41℃の一定温度で、3種類の酵素 (逆転写酵素 (AMV-RT)、リボヌクレアーゼH (RNase H)、RNAポリメラーゼ (T7 RNA polymerase))、2種類のプライマー (フォワード、リバース) および基質の存在下、途中合成される二本鎖DNAを介し、鋳型に相補的な配列の1本鎖RNAを増幅します。



C. 核酸クロマトグラフィー

NASBA増幅産物が着色ラテックス標識オリゴプローブ及びメンブレン上の捕捉プローブ (固相化オリゴDNA) とサンドイッチハイブリダイゼーションすることにより、メンブレン上に着色ラテックスのラインが形成されます。このラインを目視で確認することにより、検体中のCPE産生ウエルシュ菌の存在有無を判定します。

増幅反応の成否を判定するため、プライマー溶液にはインターナルコントロール (IC) のテンプレート及びプライマーが含まれており、CPE mRNAと共に増幅されます。核酸クロマトグラフィーにおいて、ICの検出ラインはCPEの検出ラインとは異なる位置で検出され、増幅反応が阻害された場合、ICとCPEのラインは検出されません。



2. 特徴
   1) エンテロトキシン産生ウエルシュ菌の生菌 (mRNA) を検出します。
   2) 菌培養不要で、食品試料から直接、標的となる核酸を抽出します。
   3) 核酸抽出、増幅、検出までに要する時間は1時間以内です。
   4) インターナルコントロールを共増幅することにより、増幅阻害による偽陰性を防止します。

【操作上の注意】

1. 測定試料の性質、採取方法
   1) あらかじめ食品試料からストマッカー等を用いて生理食塩液10%乳剤を作製してください。

      例：食材25gを生理食塩水225mLと混合し、ストマフィルターに入れ、ストマッカーで1分間混和する。ストマフィルターのろ過液を10%乳剤として使用する。

   2) 検体からの10%乳剤調製には、各施設で実施されている方法に従ってください。装置 (ストマッカー等) を使用する際は、各装置の使用説明書に従ってください。

2. その他
   1) RNase等による核酸分解防止のため、検体からの10%乳剤調製を含め操作全般にわたって必ずマスク及びグローブを着用してください。
   2) 検出操作は20～30℃の室内温度で実施してください。

＊【用法・用量（操作法）】

1. 試薬の調製方法
   1) NASBA反応溶液：
      NASBA試薬にプライマー溶液を55 μL加え、直ちにボルテックスミキサーを用いて十分に溶解してください。調製後は、氷上に置かずに常温で静置してください。
      溶解後は遠心しないでください。チューブ壁面に液滴がある場合は手でチューブを振り落とす程度にしてください。
      調製後に長期保存する場合は、−70℃以下で保存してください。

   2) NASBA酵素液：
      NASBA酵素試薬をスピンダウンした後、NASBA酵素溶解液を30 μL加え、10秒程度待ってからタッピングにより溶解してください。
      ボルテックスミキサー等による激しい混和は酵素が失活するため、行わないでください。
      調製後に長期保存する場合は、−70℃以下で保存してください。

   3) 核酸抽出試液、検出ストリップ、展開液：
      室内温度 (20～30℃) に戻した後、そのまま使用してください。
      検出ストリップは検出操作の直前に開封してください。

2. 必要な器具・器材・試料等
   1) マイクロピペット (10、200、1000 μL)、フィルターチップ
   2) ヒートブロック (41、90℃)
   3) ボルテックスミキサー
   4) 小型卓上遠心機

3. 操作法
   A. 核酸抽出
   1) 検体として10%乳剤 1 mLを 1,890 G以上で1分間遠心した後、沈殿物および液量として100 μL相当を残して、上清を除去します。
   2) 上清除去後の検体 100 μLに核酸抽出試液を 400 μL添加し、ボルテックスミキサーで10秒間混和して沈殿物を分散させます。
   3) 90℃で5分加熱し、ボルテックスミキサーで5秒間混和した後、1,890 G以上で10秒間遠心し、チューブを氷上に静置します。
   4) 上清部分を核酸抽出物としてNASBA反応に使用します。

      注1：核酸抽出物は氷上に静置後15分以内にNASBA増幅反応を開始してください。

   B. NASBA反応
   1) 付属の反応用チューブにNASBA反応溶液を5 μL分注し、常温で静置します。
   2) 次いで反応用チューブに上述 A.4)で得られた核酸抽出物を2.5 μL分注し、10回ピペッティングし、軽く遠心します。

      注2：反応用チューブ内の液を散らさなければ遠心操作は不要です。衝撃によるRNAの分解を抑えるため、ボルテックスミキサー等による混和は行わないでください。

   3) 反応用チューブを41℃のヒートブロックで5分間加温します。

      注3：加温操作中にNASBA酵素液を調製してください (調製方法は「1. 試薬調製法」を参照)。

   4) 41℃のヒートブロック上で反応用チューブ内の反応液に直接NASBA酵素液を2.5 μL添加し、5回ピペッティングして混合します。そのまま41℃のヒートブロックで30分間加温します。

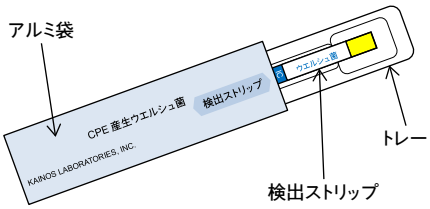
      注4：NASBA酵素液を添加後最初の5分間は、NASBA反応の重要な過程であるため、遠心など温度低下を招く操作は行わないでください。

   5) 反応終了後、直ちに検出操作に移ります(「C. 核酸クロマトグラフィー」を参照)。

      注5：NASBA増幅産物を保存する場合、増幅反応終了後の反応用チューブを−20℃以下で保存してください。作業前に常温に戻してから使用してください。

   C. 核酸クロマトグラフィー
   1) 検出ストリップは室内温度 (20～30℃) に戻してからアルミ袋を開封し、検出ストリップをトレーごと取り出した後、さらにトレーから取り出します。

      注6：アルミ袋の開封は検出操作の直前に行ってください。

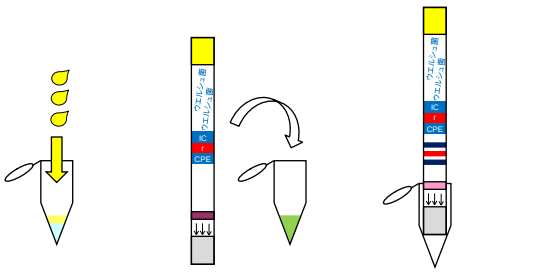


   2) 増幅反応終了後の反応用チューブ (NASBA増幅産物) に展開液を3滴 (約90 μL) 加えます。
   3) 反応用チューブに検出ストリップを矢印が下になるように挿入し、検出ストリップの先端を展開液に浸します。

      注7：反応用チューブ底に強く押しつけないように注意し、検出ストリップの下端がチューブの底にあたるまで挿入してください。

      注8：検出ストリップを入れた際、矢印の下端ラインを超えて展開液が入ってしまうと展開不良を起こすことがあるので注意してください。

   4) 反応用チューブにストリップを挿入してから15分後に判定します(「判定方法」を参照)。



1) 展開液を 3 滴加える　2) 検出ストリップ挿入　3) 挿入してから 15 分後に判定

＊ 2013 年　7 月改訂 (第 2 版)
2012 年　9 月作成 (第 1 版)

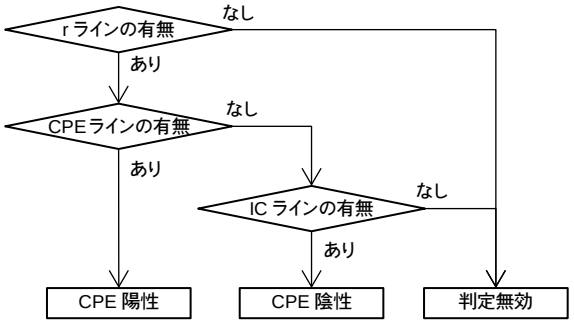
【測定結果の判定法】

1. 判定法
   1) CPE陽性：
   赤色ライン (r) の下に青色ライン (CPE) が認められる

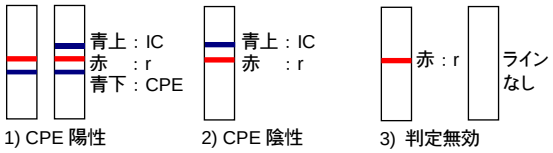
   2) 陰性：
   赤色ライン (r) の上に青色ライン (IC) が認められ、下に青色ライン (CPE) が認められない

   3) 無効：
   赤色ライン (r) のみ認められる (増幅反応不成立)
   赤色ライン (r) が認められない (展開不良)

判定フロー：



判定例：



2. 判定上の注意
   1) 判定は20分以内に行ってください。
   2) 検出ストリップを挿入してから15分経過後、赤色のリファレンスラインが認められない場合、再検査してください。
   3) メンブラン上にラテックスの着色が全体的に残っていても、赤色のリファレンスラインが認められていれば核酸クロマトグラフィーの反応は有効です。
   4) CPE強度陽性の場合、ICライン (赤色ラインの上の青色ライン) が薄くなることがあります。赤色のリファレンスラインとその下のCPEラインが認められる場合は、CPE陽性と判断してください。
   5) ICラインおよびCPEラインが認められない(赤色のリファレンスラインのみ認められる) 場合は、検体中の共存物質等により核酸増幅反応が正常に行われていないことを示します。
   6) 検体により、検体中の目的成分以外の物質との反応や妨害反応を生じることがあります。結果に疑問がある場合は、再検査や他の検査方法により確認してください。
   7) 検査結果を保存する場合は、検出ストリップをトレーに戻し、添付のプレートシールで密閉保存してください。

【性能】

1. 性能
   1) 最小検出感度
   1×10^5 cfu/g

   ・菌接種試験で確認した食品試料：
   カレー、クリームシチュー、麻婆豆腐、八宝菜、春巻き、肉じゃが、おから

   2) 交差反応性
   以下の細菌株について本製品を用いて試験を行った結果、すべて陰性を示し、交差反応性は認められませんでした。

細菌名	
Aeromonas hydrophila	*Staphylococcus aureus*
Aeromonas sobria	*Vibrio fluvialis*
Bacillus cereus	*Vibrio mimicus*
Clostridium perfringens (cpe-)	*Vibrio parahaemolyticus*

【使用上又は取扱い上の注意】

1. 取扱い上 (危険防止) の注意
   1) 検体は感染の危険性があるものとして取扱いには十分注意してください。また、検体に接触した器具等は検体と同様、感染の危険性のあるものとして取扱ってください。
   2) 試薬が誤って眼や口に入った場合は、水で十分に洗い流す等の応急処置を行い、必要があれば医師の手当を受けてください。
   3) 検査にあたっては感染の危険を避けるため使い捨て手袋を着用してください。

2. 使用上の注意
   1) 各試薬は保存温度を厳守してください。調製した試薬の保存にあたっては、コンタミネーション防止に注意してください。
   2) 増幅反応に使用する試液は2種類ありますので、調製時及び操作時に取り違えないように注意してください。
   3) NASBA増幅産物は−20℃で数週間保存可能ですが、長期間保存を行う際はディープフリーザー (−70℃以下) で保存してください。
   4) ラベルに記載されている使用期限内に使用してください。
   5) ロットの異なる試薬を混合して使用しないでください。

3. 廃棄上の注意
   1) 検査終了後の検出ストリップや増幅産物はキャリーオーバーコンタミネーションを起こす可能性がありますので、すぐに廃棄してください。
   2) 使用後の容器を廃棄する場合は、貴施設の廃棄物に関する規定に従って医療廃棄物又は産業廃棄物等を区別して処理してください。
   3) 本製品を廃棄する場合は、水質汚濁防止法等の関連法規に従って処理してください。
   4) 本製品が漏出又は飛散した場合は、少量のときは吸水紙等で拭き取り、大量のときは水で洗い流してください。

【貯蔵方法・有効期間】

貯蔵方法 ： 2〜10℃
有効期間 ： 12ヵ月 (使用期限は容器ラベル及び外箱に表示)

＊ 2013 年　7 月改訂 (第 2 版)
2012 年　9 月作成 (第 1 版)

【包装単位】

製品名		管理コード	包装
抽出試薬 増幅試薬	核酸抽出試液 NASBA試薬 プライマー溶液 NASBA酵素試薬 NASBA酵素溶解液 反応用チューブ	GP-5100	4 mL× 2 10回分× 2 110 μL× 1 10回分× 2 60 μL× 1 20本
検出試薬	検出ストリップ 展開液 プレートシール	GP-5200	1本× 20 2 mL× 1 20枚

【主要文献】

1) J. Compton ： Nature, 350：91-92 (1991)
2) 宇治家武史 ： 臨床化学, 36：19-24 (2007)

【問い合わせ先】

株式会社カイノス 学術部
〒113-0033 東京都文京区本郷2-38-18
☎ 03 (3816) 4480　　FAX 03 (3816) 6544

製造販売元
株式会社カイノス
〒113-0033　東京都文京区本郷2-38-18　☎ 03 (3816) 4485